

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

09.07.99 4

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

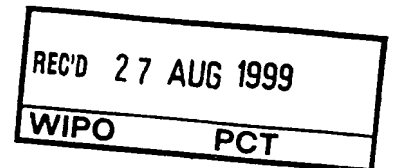
1998年10月 5日

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第319762号

出 願 人
Applicant(s):

財団法人阪大微生物病研究会

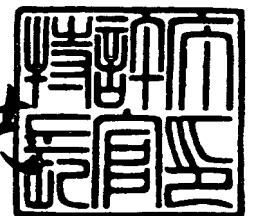
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 7月29日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3053243

【書類名】 特許願

【整理番号】 P98AF308-1

【提出日】 平成10年10月 5日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【国際特許分類】 A61K 39/12

【発明の名称】 日本脳炎ウイルス群感染症の不活化ワクチンの増強免疫原とその製造方法

【請求項の数】 4

【発明者】

 【住所又は居所】 香川県観音寺市八幡町 2-9-4 1 財団法人阪大微生物病研究会観音寺研究所内

 【氏名】 石川 豊数

【発明者】

 【住所又は居所】 香川県観音寺市八幡町 2-9-4 1 財団法人阪大微生物病研究会観音寺研究所内

 【氏名】 吉井 洋紀

【発明者】

 【住所又は居所】 香川県観音寺市八幡町 2-9-4 1 財団法人阪大微生物病研究会観音寺研究所内

 【氏名】 大西 敏之

【発明者】

 【住所又は居所】 香川県観音寺市八幡町 2-9-4 1 財団法人阪大微生物病研究会観音寺研究所内

 【氏名】 今川 忠

【発明者】

 【住所又は居所】 香川県観音寺市八幡町 2-9-4 1 財団法人阪大微生物病研究会観音寺研究所内

 【氏名】 石橋 正英

【特許出願人】

【識別番号】 000173692

【氏名又は名称】 財団法人阪大微生物病研究会

【代表者】 務▲たい▼ 方彦

【代理人】

【識別番号】 391021905

【氏名又は名称】 納 壽一郎

【電話番号】 0875-25-4171

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 002576

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9111393

【書類名】 明細書

【発明の名称】 日本脳炎ウイルス群感染症の不活化ワクチンの増強免疫原とその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 中和抗体価で測定した不活化ワクチンとしての免疫原性が、マウス脳を出発材料に用いることにより生産した免疫原の 2 倍から 10 倍である増強免疫原。

【請求項 2】 細胞株で培養したウイルスを不活化することを特徴とする、中和抗体価で測定した不活化ワクチンとしての免疫原性が、マウス脳を出発材料に用いることにより生産した免疫原の 2 倍から 10 倍である増強免疫原の製造方法。

【請求項 3】 中和抗体価で測定した不活化ワクチンとしての免疫原性が、マウス脳を出発材料に用いることにより生産した免疫原の 2 倍から 10 倍である増強免疫原を、免疫を奏する量、含有する不活化ワクチン。

【請求項 4】 不活化ワクチンが日本脳炎ワクチンである請求項 1 に記載の増強免疫原。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、フラビウイルス属の日本脳炎ウイルス群により生じる感染症の診断剤とワクチン、就中、日本脳炎ワクチンの免疫原とその製造方法、並びに日本脳炎ワクチンに関するものである。

【0002】

【従来の技術】

以下、日本脳炎ウイルス群による感染症の代表例として、日本脳炎をあげ、そのワクチンにつき記載する。最初の日本脳炎ワクチンは、1954年に実用化された。このワクチンは、マウス脳内で培養したウイルスから調製した抗原を有効成分とし、その精製度は低く、不純物が多いため、アレルギー性の中樞神経障害を誘発する危険性があった。その後、改良され、アルコール沈殿、硫酸プロタミ

ン処理、及び超遠心法等の組合せによる高度精製ワクチンが1965年に実用化され、品質が著しく向上した。そして、かかるワクチンとその製造技術が踏襲され現在に至っている[“Vaccine Handbook”, p. 103-113, Researcher's Associates, National Institute of Health (Japan), Maruzen (Tokyo) 1996]。一方、マウス脳を使用しない不活化ワクチンの開発も試行された。即ち、1965年に日本脳炎ワクチン研究会が結成され、初代細胞培養による組織培養ワクチンが開発された。しかし、不活化ワクチン抗原の量産に要する膨大な量の初代細胞培養の確保が製造コストの上で不可能であったので、このワクチンは実用化に至らなかった。これは、その当時、ワクチン製造用の認可細胞が初代培養細胞に限定され、継代細胞株の使用が危険視かつ否認されていたためである。尚、組織培養の日本脳炎生ワクチンに関しては、中国で初代ハムスター腎細胞培養で増殖させた弱毒ウイルスを有効成分として用いる生ワクチンが1994年頃に実用化されている。しかし、中国以外の諸外国では、有効性と安全性が未確認であり、その使用は知られていない。更に、1986年頃から組換え遺伝子技術を駆使した日本脳炎ワクチン、例えば、エンベロープ(E)タンパク抗原、組換えウイルス等を用いる第二世代ワクチンが多種多様に報告されている。しかし、これ等のワクチンはいずれも、実験あるいは前臨床試験の段階にあり、未だ実用化されていない(“Vaccine”, 2nd ed., pp. 671-713, S. A. Plotkin, 及びE. A. Mortimer 著, W. B. Saunders Co. 1994; The Jordan Report, pp. 26-27, 1998)。

【0003】

また、不活化ワクチン用の抗原あるいは免疫原の量産に細胞株を用いる技術としては、例えば、ポリオ(米国特許第4, 525, 349号)、狂犬病(米国特許第4, 664, 912号)、A型肝炎(米国特許第4, 783, 407号)、ダニ媒介脳炎(米国特許第5, 719, 051号)等の各ウイルス抗原の量産におけるVer o細胞の使用が公知である。これ等のうち、前2者の実用化はそれぞれ衆知であるが、後2者については、量産された各抗原のワクチンとしての安

全性と有効性の確認並びに実用化は知られていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

従来の日本脳炎ワクチンの有効成分はマウス脳内で増やした日本脳炎ウイルスの不活化粒子であり、ワクチン用抗原の量産には膨大な数のマウスとその取り扱いが必要であった。そのため、生産コストが非常に高くなり、更に、製品中へのマウス由来ウイルスの迷入やマウス脳成分の混入等の危険性を常に伴い、特に、精製工程と品質管理は複雑多岐にわたり、その上、最近では製造用マウスの入手が困難となり、計画的なワクチン製造に支障が生じていた。また、マウスを犠牲にする従来技術は、動物愛護や宗教の観点から望まれなかった。

【0005】

【課題を解決するための手段】

この発明では、前記課題の解決手段として、マウスの代わりに細胞株を用いてウイルス粒子を量産する。これにより、生産コストが大幅に低減されるだけでなく、バイオハザード対策、製造作業手順、精製工程、品質管理、製造計画等が省力化される。就中、特筆すべきは、本発明が新規なウイルス粒子の予期不能の驚くべき発見に基づいていることである。即ち、この発明により、従来の不活化ワクチンの免疫原に比べ、その免疫原性が2倍から10倍に増強された新規なウイルス粒子ないしは免疫原とその製造方法が提供される。特に、日本脳炎不活化ワクチンの免疫原や診断剤として卓抜した機能を有する新規な日本脳炎ウイルス粒子とその製造方法が提供される。尚、かかる粒子は、技術的には、細胞株で日本脳炎ウイルスを培養する工程及び／又はその後の濃縮・精製・不活化を含む一連の工程下で生成されるが、その純科学的な生成機構は未だ定かでない。

【0006】

【発明の実施の形態】

この発明の実施形態の特徴は、代表例としての従来の日本脳炎ワクチンの免疫原と本発明のそれとの間の物質及び製造の両側面の比較において顕現される。これを考慮し、以下、上記両者の免疫原性及び形態の相違、免疫原としてのウイルス、ウイルス培養の宿主、ウイルスの精製、ウイルスの不活化、力価試験、及び

電子顕微鏡解析の順に説明する。

【0007】

従来の日本脳炎ワクチンの免疫原：これは、薬事法（昭和35年法律第145号）第42条第1項の規定に基づく厚生省告示第217号「生物学的製剤基準」に定める「日本脳炎ワクチン」又は「乾燥日本脳炎ワクチン」の規程に準拠して製造かつ、安全性、有効性等に係る種々の試験を行い、その適格性が確認された市販の日本脳炎ワクチンの免疫原を意味する。尚、この免疫原は、ワクチン製造用株の日本脳炎ウイルスをマウス脳内に接種して増殖させ量産した後、その発症マウス脳の磨砕物を出発材料として高度精製すると共に、不活化剤で不活化した日本脳炎ウイルス粒子、即ち、マウス脳（MB）に由来の粒子あるいは免疫原であり、以下、「MB粒子」又は「MB免疫原」と略記する。

【0008】

本発明に係る日本脳炎ワクチンの免疫原：これは、日本脳炎ウイルスの培養宿主に細胞株の培養細胞を用いる以外は前述の日本脳炎ワクチンの規程に準拠して製造かつ、種々の品質管理試験を行い、その適格性が確認された日本脳炎ワクチンの免疫原を意味する。尚、この免疫原は、日本脳炎ウイルスを細胞株の培養細胞に接種して増殖させ量産した後、その細胞培養物を出発材料として高度精製すると共に、不活化剤で不活化した日本脳炎ウイルス粒子であり、次の（1）と（2）に示す特徴を併せて有する：

（1）後述する力価試験に基づく中和抗体価で測定した不活化ワクチンとしての免疫原性が、MB粒子又はMB免疫原の約2倍から約10倍に増強された（*reinforced*）免疫原である（以下「R粒子」又は「R免疫原」と略記する）。及び

（2）電子顕微鏡解析に基づく粒子構造、特に、粒子表面又はエンベロープ層の外観に関し、MB粒子が滑らかであるのに対し、R粒子は粗いか若しくは毛羽立っている。

尚、以上の日本脳炎ワクチンの免疫原の説明は、本発明に係る日本脳炎ウイルス群により生じる感染症のワクチン用免疫原の代表例として記載されたものであり、本発明に係るワクチン、例えば、日本脳炎ワクチンは、液状又は乾燥の形態で

、密栓したバイアル瓶あるいは熔封したアンプルに入れて提供され、液状製剤はそのまま、乾燥製剤は溶解液で液状にもどした後、これをワクチン被接種者一人当たり0.1～1.0mlずつ皮下接種することにより使用する。

【0009】

免疫原としてのウイルス：この発明に係る日本脳炎ウイルス群には、日本脳炎、クンジン、マレーバレー脳炎、セントルイス脳炎、ウェストナイル等のウイルスが含まれる。その詳細は、Archives of Virology, Supplement 10, pp. 415-427, 1995 ("Virus Taxonomy", Classification and Nomenclature of Viruses; Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses)に記載の通りである。これ等のうち、日本脳炎ウイルスについては、例えば、マウス脳由来の北京-1株[この株を本発明者らが更にマウス脳内で継代することにより確立したJWS-P-4株(Am29Sm1Am5)を以下、「北京株」という]、中山-予研株(以下、「中山株」という)、JaOArS982株、JaOH0566株、その他の株(詳細は、Microbiology and Immunology, 41, 241-252, 1977に記載されている)等を用いることができる。

ウイルス培養は、後述する細胞株の培養細胞にウイルスを接種の後、感染細胞を維持培養することにより行う。培養方法は後述の細胞培養と同じである。尚、以下、便宜的に、ウイルス培養物を低速遠心した上清を「細胞外ウイルス」と呼び、一方、遠心ペレットから集めた感染細胞を0.2%(W/V)ウシ血清アルブミン添加MEM(Eagle's Minimum Essential Medium)で元の体積に浮遊させて超音波処理した後、これを再度、低速遠心した上清を「細胞内ウイルス」と称する。

【0010】

ウイルス培養の宿主：ウイルス培養の宿主として既知の細胞株を用いることができる。例えば、二倍体細胞株であるWI-38, MRC-5, FRhL-2等、また、連続継代細胞株であるVero, BHK21, CHO等が使用できる。

更に、常用のCV-1, BSC-1, MA104, MDCK, CaCO-2等や、ウイルスワクチンの製造に用いられているDBS-FLC-1, DBS-FLC-2, DBS-FRHL-2, ESK-4, HEL, IMR-90, WRL68等も使用できる[“ATCC Microbes & Cells at Work”, 2nd ed., pp. 144, American Type Culture Collection (ATCC) 1991, USA]. 前述の日本脳炎ウイルス株の培養宿主には、例えば、Vero (ATCC番号CCL-81), BHK-21 [C-13] (ATCC番号CCL-10), C6/36 (ATCC番号CRL-1660)等の使用が好ましい。但し、これ等の細胞株の使用に際しては、WHO (World Health Organization) が勧告の生物学的製剤の製造用細胞に関する基準 (Requirements for Biological Substances No. 50) に準拠して迷入因子や腫瘍形成等に関する種々の試験を行い、ワクチン製造用細胞としての適格性を確認する必要がある (WHO Technical Report Series, No. 878, pp. 19-52, 1998)。

上記株の細胞培養には、静置培養、灌流システム培養、振盪培養、ローラーチューブ培養、ローラーボトル培養、浮遊培養、マイクロキャリアー培養等を採用できる。例えば、細胞のマイクロキャリアーとして市販の種々の規格のcytodox [ファルマシアバイオテク社 (スウェーデン) 製] を用い、市販の各種、動物細胞培養装置により行うことができる。

【0011】

ウイルスの濃縮と精製：例えば、低速遠心、限外濾過膜による濃縮、ゾーナル超遠心等により行う。かかる操作は、約4℃～室温で行う。

【0012】

ウイルスの不活化：ホルマリン、 β -プロピオラクトン、グルタルジアルデヒド等の不活化剤を、ウイルス浮遊液に添加混合し、ウイルスと反応させることにより不活化する。例えば、ホルマリンを使用の場合、その添加量は約0.005-0.1% (V/V)、不活化温度は約4-38℃、不活化日数は約5-180日である。

【0013】

力価試験：前述「生物学的製剤基準」に定める「日本脳炎ワクチン」に規定の「力価試験」に準拠して行う。即ち、4週齢の ddY マウスを各群 15 匹ずつ使用し、10 倍階段希釈した各ワクチンを 0.5 ml / マウス、腹腔内に接種した後、その 7 日目に第 2 回接種を行い追加免疫する。第 2 回接種後、7 日目に各マウスから個体別に採血して血清を分離の後、各群毎にマウス血清を等量プールし、56℃にて 30 分間の非働化を行い、これを免疫血清として中和試験に供する。中和試験にはニワトリ胚細胞培養を使用し、攻撃ウイルスにはマウス脳由来の北京株を使用する。中和抗体価、即ち、力価は、攻撃ウイルスが形成するプラーク数を 50% 減少させる上記免疫血清の最高希釈倍数の常用対数值 (log) を以て表わす。

【0014】

電子顕微鏡解析：例えば、2% (W/V) 酢酸ウラニルを用いるネガティブ染色法により調製したウイルス標本を日立電子顕微鏡（株式会社日立製作所製）で観察し、写真撮影により得られる 2 万～10 万倍のウイルス粒子画像について解析する。

【0015】

以下、この発明の態様並びに構成と効果を実験例及び実施例を示し、具体的に説明する。但し、この発明は、これ等に限定されるものではない。

【0016】

【実験例 1】

ウイルス感染価の測定：後述の Ver o-M 細胞を用いるプラーク法により、ウイルス感染価、PFU (plaque-forming unit) / ml で計数した。

【0017】

ウイルス抗原量の測定：日本脳炎ウイルス抗原量は、抗日本脳炎ウイルスモノクローナル抗体 [Group-8 Clone 503 (東京都神経科学総合研究所保井博士から分与)] IgG を用いる ELISA により測定した。尚、ELISA 値は、マウス脳由来自家標準品 (北京株) を 100 単位とし、その相対値

を平行線検定法により算出した。

【0018】

HA試験：試験にはU型マイクロプレートを使用した。至適pHに調整したリン酸緩衝液による0.33% (V/V) ガチヨウ赤血球浮遊液とウイルス液とを等量混合の後、37℃で60分間、反応させ、赤血球凝集の有無を判定した。尚、HA価は、赤血球凝集が陽性のウイルス液の最高希釈倍数で表わした。

【0019】

ウシ血清抗原量の測定：抗ウシ血清ヤギIgGを用いるELISAにより測定した。ウシ血清標準抗原におけるタンパク質含量に対する相対値を平行線検定法により算出し、その値を抗原量とした。

【0020】

【実験例2】

ウイルス培養用の細胞株の増殖性：

付着性の2系統のVero細胞、Vero-A (ATCC番号CCL-81に由来)とVero-M (国立感染症研究所から入手したVeroに由来)、また、3系統のBHK-21細胞、BHK/WI2 (大阪府立公衆衛生研究所から入手した付着性BHK-21に由来)、BHK/NIAH (国立家畜衛生試験場から入手した浮遊性BHK-21に由来)及びBHK-21 [C-13] (ATCC番号CCL-10に由来)、並びに力由来のC6/36細胞 (ATCC番号CRL-1660に由来)をウイルス培養用の候補細胞株とし、これ等の各細胞株の増殖性を観察した。2系統のVero、並びにBHK/WI2とBHK-21 [C13]は、各々 1.5×10^5 細胞/mlになるよう増殖培地で調製し、これを37℃で3日間、静置培養した後、それぞれ細胞数を計測した。上記と同様にして、浮遊性BHK/NIAHでは 2.0×10^5 細胞/mlを調製し、これを37℃で3日間、振盪培養の後、また、C6/36では 1.0×10^5 細胞/mlを調製し、これを28℃で7日間静置培養の後、各々細胞数を計測した。尚、増殖培地には、最終濃度8% (V/V) ウシ血清を添加混合したMEM (Eagle's Minimum Essential Medium)を用いた。その結果、2系統のVero、並びにBHK/WI2とBHK-21 [C13]

は7.0~9.0×10⁵細胞/ml, 浮遊性BHK/NIAHとC6/36は, 2.8×10⁶細胞/mlであった.

【0021】

【実験例3】

候補細胞株における日本脳炎ウイルスの増殖性

実験例2で用いた候補細胞株につき, C6/36細胞は28℃で7日間, それ以外の細胞は37℃で3日間培養の後, 各細胞到北京株をMOI (multiplicity of infection) が0.1になるよう接種し, 細胞外ウイルス量の経時的变化を, ウイルス感染価(PFU), ウイルス抗原量(ELISA価)及びHA価で測定し比較した. その結果を表1に示す. 尚, 数値は, 2回実験した各細胞株でのウイルス増殖曲線における最高値の平均値であり, C6/37では, ウイルス感染価は培養3日目に, ELISA価とHA価は共に, 培養4日目に各々最高値であった. その他の細胞株では, ウイルス感染価は培養2日目に, ELISA価とHA価とは培養3日目又は4日目に各々最高値であった.

表1

細胞	PFU/ml	ELISA価	HA価
付着性			
Vero-A	1.2×10 ⁸	58	640
Vero-M	5.7×10 ⁷	35	320
BHK-21/WI2	1.5×10 ⁸	27	40
BHK-21[C13]	2.3×10 ⁸	48	320
浮遊性			
BHK-21/NIAH	7.0×10 ⁷	37	40
C6/36	2.6×10 ⁸	103	320

【0022】

【実験例4】

Cytodexの種類とVero-A細胞の増殖性： 1.5×10^5 細胞/mlのVero-A細胞浮遊液を500mlずつ入れた細胞培養用フラスコ3本の各々に、Cytodex 1, 2又は3のいずれか1種を 1.5 g/L になるように添加の後、 37°C にて回転数40rpmによる攪拌下で7日間、培養した。その結果を以下に記載する：培養7日目の細胞数/mlは、Cytodex 1, 2, 及び3について、それぞれ 7.5×10^5 , 8.3×10^5 , 及び 9.4×10^5 であった。また、Cytodex 1での7日間培養により、全てのビーズの表面に百個以上のVero-A細胞が隙間なく付着し増殖した。

【0023】

【実験例5】

Cytodexの濃度とVero-A細胞の増殖性： 1.5×10^5 細胞/mlの細胞浮遊液を500mlずつ入れた細胞培養用フラスコ4本（A, B, C及びD）のうち、AとBにはCytodex 1を各々 1.5 g/L , Cには 3.0 g/L , Dには 4.5 g/L になるようそれぞれ添加した後、 37°C にて回転数40rpmによる攪拌下で7日間、培養し、細胞数と細胞が付着したビーズの割合（付着率）を計測した。付着率の算出には、200個以上の各ビーズを観察し、5個以上の細胞が付着しているビーズを細胞付着ビーズとした。尚、cytodex 1を 1.5 g/L 添加したAは、培養終了時まで同じ増殖培地で培養し、残りのB, C及びDの各フラスコについては、培養開始から3, 4, 及び5日目の各日に、培養液の1/2量を新鮮な増殖培地と交換した。その結果を以下に記載する：培養液の交換の有無（AとB）は細胞数には影響しなかった。7日間培養後の細胞数/mlは、Bが 9.1×10^5 , Cが 7.7×10^5 , Dが 8.0×10^5 であった。付着率は、AとBが培養1日目から98%以上で培養4日目には100%に達し、培養1日目のCは93%, Dは80%と低かった。しかし、培養6日目にはA, B, C及びDは共に100%に達した。

【0024】

【実験例6】

Cytodex 1により高密度培養したVer o-A細胞の増殖性：cyt o dexの濃度と細胞数をそれぞれ3倍にした高密度培養を行った。4.5×10⁵細胞/mlのVer o-A細胞浮遊液に、Cytodex 1を4.5g/Lになるよう添加して、培養液量50Lの動物細胞培養装置を用いて培養した。回転数は最初の24時間が15rpm、それ以降は20rpm、pH7.0、溶存酸素を5ppmに設定した。培養3日目と5日目に培養液の1/2量を新鮮な増殖培地と交換した。その結果を以下に記載する：培養5日目の細胞数は2.0×10⁶細胞/ml、7日目には2.6×10⁶細胞/mlであった。また、培養2日目における細胞のビーズへの付着率は100%であった。

【0025】

【実験例7】

ワクチン製造用ウイルス候補株のVer o-A細胞における増殖性：シャーレで3日間静置培養したVer o-Aに、マウス脳由来の日本脳炎ウイルスの上記候補株、北京株、中山株、JaOH0566、及びJaOArS982の4株をそれぞれMOIが0.1になるように接種し、ウイルスを90分間吸着後、2% (V/V) ウシ血清を含むMEMを加え37℃で7日間培養した。そして、細胞外および細胞内ウイルスの感染価と抗原量の経時的变化を観察した。その結果を以下に記載する：感染価について、中山を除く3株の細胞外ウイルスは培養2日目の値が最も高く1.0×10⁸PFU/ml以上、細胞内ウイルスのそれは細胞外ウイルスの1/3以下であり、中山の細胞外ウイルスのそれは、培養3日目が最高であったが、他の3株の値の1/5以下であった。ELISA抗原価に関し、中山を除く3株の細胞外ウイルスのそれは培養3～5日目が最も高く、いずれも約70単位、細胞内ウイルスのそれは細胞外ウイルスの1/5以下であり、中山では培養5～7日目にプラトー (plateau) となり、30単位であった。HA価は、培養2～4日目の細胞外ウイルスにつき、中山株が160、他の3株は640～1280であった。

【0026】

【実験例8】

Cytodex 1によるVer o-A細胞培養での北京株の増殖：cyt o

d e x 1を用いて培養した20Lの細胞(1.96×10^6 細胞/ml)にV e r o - Aで4代継代した北京株ウイルスをMOIが0.1になるよう接種し、ウシ牛血清を含まないMEMで培養した。その結果を以下に記載する：細胞内ウイルスの感染価は培養2日目が最も高く 1.3×10^8 PFU/ml、細胞外ウイルスは培養3日目が最も高く 4.0×10^8 PFU/mlであった。ELISA抗原価は細胞外ウイルスは培養4日目が最も高く67単位、細胞内ウイルスは培養3日目が最も高く26単位であった。細胞外ウイルスのHA価は培養3日目で320であり、細胞内ウイルスは40であった。

【0027】

【実施例1】

試作ワクチンの調製：C y t o d e x 1を用いて培養したV e r o - A細胞に、V e r o - Aで4代継代した北京株をMOIが0.1になるように接種し、ウシ血清を含まないMEMで37℃にて4日間、ウイルス培養した。培養上清を採取し、分画分子量が100kDaの限外濾過膜で1/10量に濃縮した後、最終濃度1/1500(V/V)量のホルマリンを添加混合し、ウイルスを不活化した。不活化条件は、20℃で20日間であった。次に、不活化ウイルス浮遊液を、蔗糖密度勾配ゾーナル超遠心に2回かけ、ウイルスを精製した。2回超遠心の条件は共に、P35ZTローター(日製産業社製)を用いる25-50%(W/W)蔗糖密度勾配、30,000rpm、13時間であった。これよりウイルス画分を採取し、PBS(phosphate-buffered saline)で透析の後、これをワクチン原液とした。この原液について、前記の「生物学的製剤基準」に準拠して安全性と有効性に関する各種試験を行い、ワクチンとしての適格性を確認した。次いで、この原液のタンパク質含量が $7.8 \mu\text{g/ml}$ になるよう199培地で希釈調整し、これを3ml容のバイアル瓶に1mlずつ分注の後、各瓶を密栓し、試作ワクチンとした。尚、タンパク質含量は、前述の「生物学的製剤基準」に規定の一般試験法(加熱トリクロル酢酸により沈殿するタンパク質をローリー法で定量する)に準拠して測定した。

【0028】

【実施例2】

試作ワクチンの主な工程時の性状：実施例1に記載の試作ワクチンの主な工程の各々を終了した時点で採取した各検体について、実験例1に記載の各種試験を行った。その結果を以下に示す：ウイルスの培養上清、即ち、ウイルス浮遊液の感染価は 2.2×10^8 PFU/ml, ELISA抗原価は70単位, HA価は160であった。該ウイルス浮遊液を限外濾過膜を用いて1/10容に濃縮したときの感染価及び抗原量は共に10倍高い値を示した。ゾーナル超遠心1回後のウイルス抗原について、蔗糖濃度41%と34%の2つの画分にその極大値が見られた。電子顕微鏡観察によれば、41%の画分はウイルス粒子であり、34%の画分はウイルス抗原活性を有するウイルス粒子より微細な粒子であった。また、細胞培養からの持ち込みウシ血清抗原は、蔗糖濃度28%以下の画分に検出され、ウイルス粒子画分から分離された。上記のウイルス粒子画分を再度、ゾーナル超遠心により精製したウイルス粒子は、蔗糖濃度40%の画分に単一性のピークとして確認された。試作ワクチンのELISA抗原価は45単位、タンパク質含量は $7.8 \mu\text{g/ml}$ あった。

【0029】

【実施例3】

試作ワクチンの電子顕微鏡観察：試作ワクチンとマウス脳由来の市販ワクチンとの両者について、前述の電子顕微鏡解析を行った。その結果、いずれも均一なウイルス粒子集団が検出された。しかし、ウイルス粒子表面又はエンベロープ層の外観に関し、市販ワクチン中のMB粒子が滑らかであるのに対し、この発明に係る試作ワクチン中のR粒子は粗いか若しくは毛羽立っていた。

【0030】

【実施例4】

試作ワクチンの免疫原性：試作ワクチン、マウス脳由来の市販ワクチン、及び力価試験用参照ワクチンの3種類の各ワクチンについて、前記の力価試験を行い、免疫原性を測定した。即ち、これ等の各ワクチンをPBSで希釈してマウスを免疫し、得られた各血清の北京株に対する中和抗体価を比較した。ワクチンの希釈倍数と中和抗体価との関係を表2に示す。試作及び市販両ワクチンの各希釈倍数（同等タンパク含量）における中和抗体価（常用対数値）の差は0.38～1

． 11 であった。即ち，試作ワクチン免疫原の免疫原性は，市販ワクチン免疫原のその約 2 倍～約 10 倍であった。また，これを平行線検定法に基づき推計した算出倍率は約 3 倍であった。

表 2

	タンパク質含量 $\mu g / ml$	希釈倍数	中和抗体価	差 (A - B)
		8	3 . 8 7	0 . 6 4
試作ワクチン	7 . 8	1 6	3 . 5 1	0 . 3 8
(A)		3 2	3 . 3 3	1 . 1 1
		8	3 . 2 3	
市販ワクチン	7 . 5	1 6	3 . 1 3	
(B)		3 2	2 . 2 1	
参照ワクチン	5 . 4	1 6	1 . 8 7	

中和抗体価：常用対数 (log)

差 (A - B)：同一希釈倍数での [A の中和抗体価 - B の中和抗体価]，

例えば，3 . 8 7 - 3 . 2 4 = 0 . 6 4 ．

【0031】

【発明の効果】

本発明では，飼育管理が繁雑かつ微妙な上に高価なマウスの代わりに，取扱いが容易かつ低廉な細胞株を用いてウイルス粒子を量産する。従って，多数のマウスを犠牲にしないので，動物愛護の観点から歓迎され，経済的には，生産コストが大幅に低減されるばかりなく，バイオハザード対策，製造に係る作業手順，精製工程，品質管理，製造計画等が著しく省力化される。就中，従来の不活化ワクチンの免疫原性に比べ，その免疫原性が約 2 倍～約 10 倍に増強された新規なウイルス粒子ないしは免疫原とその製造方法が提供される。特に，この発明は，日本

脳炎不活化ワクチンの免疫原や診断剤として卓抜した機能を有する新規な日本脳炎ウイルス粒子とその製造方法を提供する。従って、この発明は、低廉でしかも優れた品質のワクチンや診断剤の提供を可能にし、日本脳炎ウイルス群感染症の予防と診断の全世界にわたる普及、及びその飛躍的な向上をもたらす。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】従来の日本脳炎ワクチンの生産には膨大な数のマウスが必要であった。そのため、生産コストが高く、製品中へのマウス由来ウイルスの迷入やマウス脳成分の混入等の危険性があり、精製工程や品質管理は複雑多岐であった。更に、最近では製造用マウスの入手が困難となり、ワクチン製造計画に支障が生じていた。また、マウスを犠牲にすることは、動物愛護や宗教の観点から望まれない。

【解決手段】マウスの代わりに細胞株を用いて日本脳炎ウイルス群を量産し、ワクチンを生産する。その結果、生産コストが大幅に低減され、精製工程、品質管理、製造計画等も省力化される。就中、従来の不活化日本脳炎ワクチンとしての免疫原性が約2倍から約10倍に増強された新規なウイルス粒子ないしは免疫原とその製造方法が提供される。

【選択図】 なし。

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000173692

【住所又は居所】 大阪府吹田市山田丘3番1号 大阪大学内

【氏名又は名称】 財団法人阪大微生物病研究会

【代理人】 申請人

【識別番号】 391021905

【住所又は居所】 香川県観音寺市八幡町2丁目9番41号 財団法人

阪大微生物病研究会 観音寺研究所内

【氏名又は名称】 納 壽一郎

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000173692]

1. 変更年月日 1990年 8月13日
[変更理由] 新規登録
住 所 大阪府吹田市山田丘3番1号 大阪大学内
氏 名 財団法人阪大微生物病研究会

